

A Toll-like receptor-4-polimorfizmus vizsgálata szubklinikus és krónikus gyulladásal járó betegségekben

Doktori értekezés kivonata

Reismann Péter dr.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

A Toll-like receptor-4-ről, a természetes immunválasz egyik központi mediátoráról ismert, hogy a mikroorganizmusok elleni védekezésén túl más, nem fertőző ágensek okozta betegségben is, mint például az atherosclerosisban fontos szerepet játszik. A Toll-like receptor-4 Asp299Gly és Thr399Ile genotípusáról kimutatták, hogy csökkentheti a proinflammatorikus citokin szintjét, növelheti a Gram-negatív fertőzések iránti fogékonyságot, de csökkentheti a carotisatherosclerosis kockázatát. *Célkitűzés:* A PhD-munka során három különböző, gyakori, nem fertőző betegségben vizsgálták a Toll-like receptor-4-génpolimorfizmus befolyását: a cukorbetegség és kisérzővódményeiben, az agyi ischaemiás történésben, valamint krónikus periodontitisben. *Módszer:* A Toll-like receptor-4 genotípus meghatározásához mindhárom vizsgálatban polimeráz láncreakciót és endonukleázhasítást végeztek, amelyet gélelektroforézises módszerrel detektáltak. *Eredmények:* A Toll-like receptor-4-génpolimorfizmus a diabeteses perifériás neuropathia ritkább előfordulásával mutatott összefüggést 2-es típusú cukorbetegségben, más kisérzővódménnyel nem találtak összefüggést. A polimorfizmus nem mutatott összefüggést az agyi ischaemias történés, valamint a krónikus periodontitis kockázatával. *Következtetés:* Az eredmények alapján diabetes mellitusban, ischaemiás agyi történésben és krónikus periodontitisben a Toll-like receptor-4 genotípus nem megfelelően érzékeny genetikai marker a különböző kockázatok megbecsüléséhez. Orv. Hetil., 2011, 152, 1855–1858.

Kulcsszavak: Toll-like receptor-4, polimorfizmus, diabetes mellitus, stroke, periodontitis

Study of the Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in diseases presenting with subclinical and chronic inflammation

Toll-like receptor 4, a central mediator of the innate immune response has been shown to play an important role not only in the defense mechanism against microorganism, but also other non-infectious inflammatory diseases such as atherosclerosis. The Asp299Gly and Thr399Ile, which are common co-segregation polymorphisms of the Toll-like receptor 4 gene have been shown to be associated with increased susceptibility for Gram-negative infections, but with a lower risk of carotid atherosclerosis and a reduced level of certain proinflammatory cytokines. *Aim:* The role of these polymorphisms in diabetes mellitus with its late microvascular complications, in ischemic stroke, and in chronic periodontitis was investigated in three independent studies. *Methods:* In all studies the alleles of both polymorphisms were detected by polymerase chain reaction and subsequent cleavage by restriction endonucleases followed by gel electrophoresis. *Results:* In patients with type 2 diabetes, heterozygote carriers of the Asp299Gly and Thr399Ile

polymorphisms of the Toll-like receptor 4 gene had a significantly reduced prevalence of peripheral neuropathy, while there was no association with any other diabetic microvascular complication, or with cerebral ischemia or with chronic periodontitis. *Conclusions:* Toll-like receptor 4 gene polymorphisms are not enough sensitive genetic markers for risk stratification either in diabetes mellitus or in cerebral ischemia or in chronic periodontitis. Orv. Hetil., 2011, 152, 1855–1858.

Keywords: Toll-like receptor 4, polymorphism, diabetes mellitus, cerebral ischemia, chronic periodontitis

(Beérkezett: 2011. szeptember 22.; elfogadva: 2011. október 3.)

Rövidítések

1TDM = 1-es típusú diabetes; 2TDM = 2-es típusú diabetes; PAMP = pathogen-associated molecular pattern; PRR = pattern recognition receptor; SNP = single nucleotide polymorphism; TLR4 = Toll-like receptor-4

A természetes immunválasz számos szolubilis, sejtfel-színi és intracelluláris érzékelőmechanizmust alkalmaz a lehetséges kórokozók, káros anyagok mihamarabbi felismeréséhez és eliminálásához. A szöveti homeosztázist felborító behatások a természetes immunválasz aktiválásán keresztül akutfázis-reakciót indítanak el. A természetes immunválaszban részt vevő sejtek felszínén, illetve intracellulárisan olyan receptorok találhatók, amelyek egy konzervált struktúrát vagy molekuláris jellemzőt, például egy PAMP-ot (pathogen-associated molecular pattern: kórokozó-asszociált molekuláris mintázat) ismernek fel. Ezek a PRR, mintázatot felismerő receptorok (pattern recognition receptor). Ilyen PRR a Toll-like receptor, amely a természetes immunválasz egyik központi eleme. A TLR-családnak jelenleg 13 receptora ismert. Ezek közül a mai napig a legjobban megismert receptor a TLR4. A TLR4 főbb ligandjai a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidja, a hő-sokkféherje-60 és -70, a taxol, az oxidált alacsony denzitású lipoprotein, a fibronektin. A TLR4-aktiváció az $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ -n keresztül proinflammatorikus citokinexpresz-sziót indít el [1].

A humán TLR4 génnek ismert két kozegregációs polimorfizmusa. A cDNS-en a start kodontól 3' irányba, a 896. pozícióban az adenin (A) helyett guanin (G) épül be (dbSNP adatbázisban: rs4986790). Ez a *missense mutáció* a TLR4 harmadik exonján a fehérjeszintézis során, a 299-es pozícióban egy konzervatív aszparaginsav (Asp) helyett egy glicin (Gly) aminosav beépülését okozza. Az Asp299Gly-polimorfizmussal gyakran együtt jelentkezik a 399-es pozícióban egy nem konzervatív threonin (Thr) és izoleucin (Ile) aminosavcsere. A Thr-399Ile aminosavcsere alapja, hogy a start kodontól 3' irányba, az 1196. pozícióban citozin (C) helyett timin (T) található (db SNP adatbázisban: rs4986791). Mindkét aminosavcsere a TLR4 receptor extracelluláris régióját érinti. A polimorfizmusok előfordulási gyakorisága kaukázusi populációban 10% körüli [2].

Klinikai vizsgálatok alapján a TLR4-polimorfizmust hordozó személyekben csökkent az LPS-inhalációra adott immunválasz, nagyobb a Gram-negatív baktérium okozta fertőzés kockázata [3]. Eset-kontroll vizsgálatok eredményei kimutatták, hogy a TLR4 funkcionális polimorfizmusa a gyulladásos bélbetegségekkel asszociált [4].

A prospektív, populációs mintán alapuló Bruneck-tanulmány kimutatta, hogy a TLR4-polimorfizmus növelte a súlyos bakteriális fertőzés kockázatát, azonban csökkentette az arteria carotis atherosclerosisának kockázatát. Továbbá, az Asp299Gly TLR4-polimorfizmust hordozókon a carotisartérián kisebb intima-media vastagságot mutattak ki a vad típust hordozókkal összehasonlítva [2]. A REGRESS vizsgálat alapján az Asp299Gly SNP-t hordozóknál a pravasztatinterápia szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult a cardiovascularis események számának csökkentésében a vad típust hordozókkal összehasonlítva [5].

A fenti vizsgálati eredmények alapján felmerült, hogy a TLR4 és a természetes immunválasz nemcsak a fertőzőes eredetű betegségekben játszhat kulcsszerepet, hanem behatással lehet olyan, nem fertőzőes eredetű, de krónikus gyulladással járó folyamatokban is, mint az atherosclerosis és súlyos szövődménye, az ischaemiás stroke, vagy a diabetes mellitus és kisérzőszövődményei.

Célkitűzés

Három, a modern társadalomban gyakori betegség és a TLR4 gén kozegregációs, funkcionális polimorfizmusa (Asp299Gly és Thr399Ile) közötti összefüggés vizsgálták.

Az I. számú vizsgálat alapja és célkitűzése

A természetes immunválasz szerepet játszhat mind a 1-es, mind a 2-es típusú diabetes mellitus és a diabeteses késői szövődmények kialakulásában. A természetes immunitás TLR4-függő útvonalainak jelentősége a diabeteses szövődmények kórélettanában azonban még nem ismert. Az I. számú vizsgálat célkitűzése a TLR4 gén Asp299Gly/Thr399Ile funkcionális polimorfizmusa, valamint a diabeteses nephropathia és a perifériás neuropathia közötti lehetséges összefüggés vizsgálata volt 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben.

1. táblázat | A TLR4-polimorfizmus előfordulási gyakorisága nephropathiában vagy perifériás neuropathiában szenvedő 1-es és 2-es típusú cukorbetegekben

	1-es típusú diabetes mellitus				2-es típusú diabetes mellitus			
	Vad típus n = 218	Asp299Gly/ Thr399Ile genotípus n = 26	p-érték	Esélyarány	Vad típus n = 460	Asp299Gly/ Thr399Ile genotípus n = 65	p-érték	Esélyarány
Nephropathia	51 (23,2%)	5 (19,2%)	0,81	0,79 [0,28; 2,20]	183 (39,4%)	23 (35,4%)	0,59	0,84 [0,49; 1,45]
Per. neuropathia	64 (29,1%)	7 (26,9%)	1,00	0,90 [0,36; 2,24]	236 (50,9%)	17 (26,2%)	0,0002	0,34 [0,19; 0,61]

A II. számú vizsgálat alapja és célkitűzése

A TLR4 Asp299Gly polimorfizmusa csökkent gyulladásos citokinprofilal, csökkent carotisartériaatherosclerosis-kockázattal és kisebb carotisartéria intima-media falvastagsággal társul. A carotisartéria atherosclerosis klasszikus kockázati tényezőként szerepel az ischaemiás stroke kialakulásában. Nem ismert, vajon a TLR4 gén polimorfizmusa befolyásolhatja-e az ischaemiás stroke kialakulásának kockázatát. A II. számú vizsgálat célkitűzése az ischaemiás agyi történet és a TLR4 gén Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmusa közötti lehetséges kapcsolat vizsgálata volt.

A III. számú vizsgálat alapja és célkitűzése

A periodontitis kialakulásában döntő szerepe van a Gram-negatív baktériumok kiváltotta gyulladásnak. A TLR4 gén funkcionális polimorfizmusa csökkentheti a Gram-negatív baktériumok elleni védekezőreakciót. Nem tisztázott, vajon a TLR4-polimorfizmus befolyásolja-e a periodontitis kialakulását. A III. számú vizsgálat célul tűzte ki a krónikus periodontitis és a TLR4 gén Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmusa közötti lehetséges kapcsolat vizsgálatát.

Módszerek

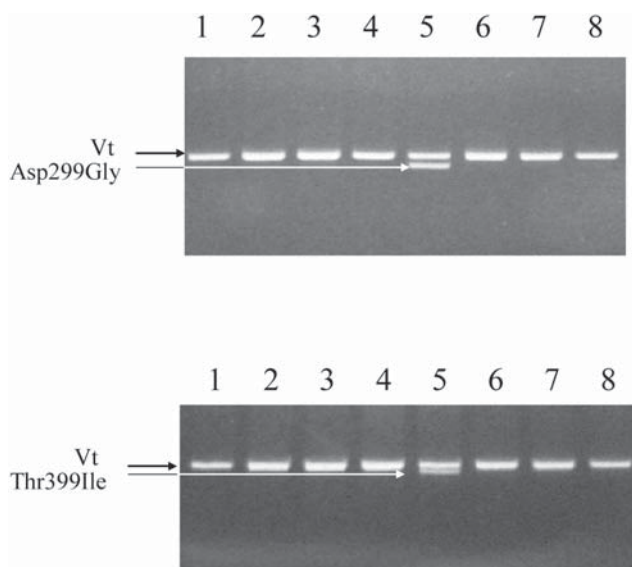
A DNS-mintákat perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekből nyerték. A koszegregációs polimorfizmust polimeráz láncreakcióval és azt követő restrikciós endonukleázhasítással detektálták (1. ábra).

A betegeket a heidelbergi egyetemi klinika járóbeteg-rendelésén, illetve stroke-fekvőbeteg-osztályon választották ki.

Eredmények

I. számú vizsgálat eredménye

Az 1-es típusú diabetes mellitus (1TDM) csoport 246 betege közül 27-en voltak heterozigóta hordozók a TLR4-polimorfizmusra. A 2-es típusú diabetes mellitus csoportban (2TDM) 530 személy közül 65 volt heterozigóta hordozó mindkét polimorfizmusra. Mind-



1. ábra

A restrikciós endonukleázhasítás utáni PCR-termék megjelenése 3%-os agarózgélben. A képen nyolc vizsgált személy TLR4 gén alléljai láthatóak

A felső ábra az Asp299Gly allélra specifikus vizsgálati eredményt mutatja. Az 1–4 és 6–8-as számú személyek alléljai homozigóta vad típusúak, míg az 5. személy heterozigóta. Vt: vad típus

Az alsó ábra a Thr399Ile allélra specifikus vizsgálati eredményt mutatja. Az 1–4 és 6–8-as számú személyek alléljai homozigóta vad típusúak, míg az 5. személy heterozigóta. Vt: vad típus

össze egy beteg volt homozigóta mindkét polimorfizmusallélra. Az 1TDM-csoportban a genotípuseloszlás nem különbözött sem a veseérintettség, sem a perifériás idegzavar tekintetében. A 2TDM-csoportban a nephropathiás szövődményt vizsgálva szintén nem mutatott különbséget a genotípuseloszlás. Azonban a perifériás neuropathia elemzésekor a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedők csoportjában erős asszociációt mutatott az TLR4 Asp299Gly és a Thr399Ile genotípus a perifériás neuropathia előfordulásával ($p = 0,0002$; OR = 0,35 [95%-os CI: 0,19–0,61]) [6] (1. táblázat).

II. számú vizsgálat eredménye

Három különböző vizsgálati csoportot elemeztek. Egy magas kockázatú csoportot: cukorbeteg-populációt ($n_d = 776$) és két eset-kontroll csoportot ($n_1 = 267$, illetve $n_2 =$

375). Egyik csoportban sem mutatkozott összefüggés a polimorfizmus hordozása és az ischaemiás agyi történés előfordulása között ($p_d = 0,812$, $OR_d = 1,13$, 95%-os CI_d : 0,45–2,78; $p_1 = 0,572$; $OR_1 = 1,26$; 95%-os CI_1 : 0,57–2,8; $p_2 = 0,106$; $OR_2 = 1,83$; 95%-os CI_2 : 0,88–3,8) [7].

III. számú vizsgálat eredménye

Összesen 129 személyt, 85 periodontitisben szenvedő és 54 kontrollszemélyt elemeztek; 12 személynél találtak a TLR4 gén heterozigóta polimorfizmusát. Az egyváltozós statisztikai számításban a periodontitis és a TLR4 genotípus közti összefüggés a szignifikancia határához közeli értéket adott, de azt nem érte el. A periodontális paramétereket vizsgálva az Asp299Gly és Thr399Ile TLR4 genotípust hordozóknál azonban szignifikánsan nagyobb csontvesztés és ínytapadási veszteség volt kimutatható [8].

Következtetések

Az I. számú vizsgálat eredményei alapján a Toll-like receptor-4 gén Asp299Gly- és Thr399Ile-polimorfizmus gyakorisága nem különbözik 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben és nem különbözik a populációs átlagtól. A TLR4 gén Asp299Gly- és Thr399Ile-polimorfizmust hordozó 2-es típusú cukorbetegségben a perifériás neuropathia előfordulása szignifikánsabb alacsonyabb a vad típust hordozókhoz képest.

A II. számú vizsgálat eredménye alapján a TLR4 gén Asp299Gly- és Thr399Ile-polimorfizmus nem befolyásolja az agyi ischaemiás történés kockázatát.

A III. számú vizsgálat eredménye alapján a TLR4 gén Asp299Gly- és Thr399Ile-polimorfizmus nem elégséges genetikai marker a krónikus periodontitis kockázatának felméréséhez.

Végkövetkeztetésként levonható, hogy diabetes mellitusban, ischaemiás agyi történésben és krónikus periodontitisben a TLR4 genotípus nem megfelelően érzékeny genetikai marker a különböző kockázatok megbecsüléséhez.

Irodalom

- [1] Reismann P., Rácz K., Tulassay Zs.: A Toll-like receptor-4-génpolimorfizmusok, valamint lehetséges klinikai szerepük fertőzésekben és krónikus gyulladásos betegségekben. *Orv. Hetil.*, 2008, 149, 1791–1799.
- [2] Kiechl S., Lorenz E., Reindl M. és mtsai: Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 2002, 347, 185–192.
- [3] Arbour N. C., Lorenz E., Schutte B. C. és mtsai: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.*, 2000, 25, 187–191.
- [4] Lakatos P. L., Lakatos L., Szalay F. és mtsai: Toll-like receptor 4 and NOD/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J. Gastroenterol.*, 2005, 11, 1489–1495.
- [5] Boekholdt S. M., Agema W. R. P., Peters R. J. G. és mtsai: Variants of Toll like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation*, 2003, 107, 2416–2421.
- [6] Rudofsky G., Reismann P., Witte S. és mtsai: Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004, 27, 179–183.
- [7] Reismann P., Lichy Ch., Rudofsky G. és mtsai: Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia. *J. Neurol.*, 2004, 251, 853–858.
- [8] Reismann P., Lichy Ch., Rudofsky G. és mtsai: TLR4-polymorphisms and the risk of chronic periodontitis. *Perio*, 2007, 4, 41–45.

(Reismann Péter dr.,
Budapest, Szentkirályi utca 46., 1088
e-mail: reismann@freestart.hu)

Az Orvosi Hetilap 2011, 152, 1632. oldalán megjelent OH Kvízre (2011. 40. szám) egy helyes megfejtés érkezett.

A beküldő: Dr. Biró László (Budapest). A nyertesnek szívből gratulálunk.

Nyereményét postán küldjük el.